

Rec'd PCT/PTO 29 DEC 2004

PCT/JP 03/08306

REC'D 15 AUG 2003

WIPO PCT

30.06.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 1 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 2 7 9 5 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 2 7 9 5 2]

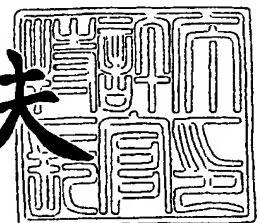
出 願 人 岡 田 秀 親
Applicant(s): 岡 田 則 子

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 8 月 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 1 4 6 :

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-070102-2

【提出日】 平成14年 7月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】

【発明の名称】 活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒト Ig
M抗体

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206

【氏名】 岡田 則子

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206

【氏名】 岡田 秀親

【特許出願人】

【識別番号】 593186459

【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206

【氏名又は名称】 岡田 秀親

【連絡先】 電話番号052-841-1009または052-85
3-8194

【特許出願人】

【住所又は居所】 名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール
桜山206

【氏名又は名称】 岡田 則子

【連絡先】 電話番号052-841-1009または052-85
3-8195

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	要約書	1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒト I g M抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性化ヒトリンパ球などを同種のヒト補体を介して溶解させるヒト I g Mモノクローナル抗体

【請求項 2】

当該ヒト I g M抗体を用いて、活性化リンパ球を溶解排除することにより、Tリンパ球の過剰反応に起因する移植拒絶反応や自己免疫病態の改善を期待できる。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、活性化リンパ球の分化抗原に反応し活性化リンパ球を同種のヒト補体を介して溶解させるヒト I g Mモノクローナル抗体とそれを含有する免疫反応制御治療剤に関する

【0002】

【従来の技術】 膠原病、自己免疫疾患、臓器移植拒否反応などにおける生体の免疫反応を制御するためにサイクロスポリン、FK506など種々の免疫抑制が開発されている。

【0003】 しかし、免疫担当細胞以外にも働くため、副作用への配慮が必要である。

【0004】 標的とする細胞に特異的に反応する抗体を用いるための検討も行われている。

【0005】 抗体が反応した標的細胞には補体が反応して細胞を溶解することが期待される。

【0006】 しかし、ヒトの細胞膜の上には、種特異的補体制御膜因子群 (DAF, Decay accelerating factor; MCP, Membrane cofactor protein; HRF20, 20kDa Homologous restriction factor など) が存在し、同

種のヒト補体の反応を防ぐために、補体反応を介した細胞溶解反応も起こらない。

【0007】一方、H I V感染細胞に反応するヒト血清中のI g M抗体は、H I V感染細胞を補体制御膜因子群に打ち勝ってヒト補体を介した細胞溶解反応起こせることを発見した。H I V感染により発現が高まるG M 2やG g 4などのガングリオシッドたいするI g M抗体がそのような作用を発揮することを知った。

【0008】ガングリオシッドのG M 2に対するヒトI g Mモノクローナル抗体としてE Bウイルスで不死化したヒトBリンパ芽球株が産生するL 5 5が報告されており、このヒトI g Mモノクローナル抗体を作用させたH I V感染細胞はヒト補体の反応を介して細胞溶解を起こすことがわかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】活性化リンパ球に特異的に反応し同種補体を介した細胞溶解を誘導するヒトI g Mモノクローナル抗体を含有する免疫反応制御治療剤等を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、ヒトの免疫グロブリンに関する遺伝子を含む染色体を導入したキリンビル社製のマウス（T Cマウス：t r a n s c h r o m o s o m e m o u s e）にH I V感染細胞を免疫して、H I V感染細胞に反応するヒト抗体を産生するマウスをえた。この免疫マウスの脾細胞をマウス骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを定法に従って作成し、そのハイブリドーマの中からH I V感染細胞に反応して、ヒト補体の存在下で感染細胞を溶解させるモノクローナル抗体を産生するクローンを選び出した。そのハイブリドーマクローンを9 F 1 1細胞株と命名した。9 F 1 1細胞株が産生する抗体である9 F 1 1はヒト μ -鎖とヒト κ -鎖からなるヒトI g Mモノクローナル抗体であった。9 F 1 1はH I V感染細胞に反応してヒト補体を介して細胞溶解反応を起こしたが、非感染リンパ球でもリンパ球が活性化したものに対しても同様な溶解反応を起した。したがって、H I V感染細胞への反応はH I V感染によりある種の活性化状態になり、9 F 1 1に反応する抗原（9 F 1 1抗原）が分化抗原として発現するためにH I V感染細胞もヒト補体を介して溶解したと理解でき

た。すなわち 9 F 1 1 抗原はリンパ球が活性化したときに発現する分化抗原であり、それに反応して補体を介した溶解反応を誘導する 9 F 1 1 抗体は活性化リンパ球を特異的に補体を介して溶解する。そこで、9 F 1 1 抗体を含有する治療剤が活性化リンパ球を抑制する治療法に活用できることが明らかとなり、本発明を完成するに至った。

【0011】 9 F 1 1 抗体をコードするカッパー鎖及びミュー鎖それぞれにおける可変領域の遺伝子の塩基配列についての解析結果は、表 1 に示すごとくである。定常領域については、既報の塩基配列とほぼ同様である。

【0012】

【表 1】

μ-鎖可変領域の塩基配列:

GCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGTCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCT
GCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGTGTCTGTACAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGT
GAAGCCCGCGCAGACCCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTAC
TTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATTGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAA
GTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCA
GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGAATTA
CTATGGTTTCGGGGAGGTACAACCTGGTTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

κ-鎖可変領域の塩基配列:

TGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAG
GTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA
CCATCACTTGTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG
CCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTG
GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTC
AACAGGCTAACAGTTTCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

【0013】

【実施例】 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施例により何ら制限されるものではない。

【0014】

【実施例 1】 9 F 1 1 抗体の特異性

被験細胞を 1×10^6 / ml の濃度に培養液中に浮遊し、これに $10 \mu\text{g} / \text{ml}$

の 9 F 1 1 抗体を等容量加えて 3 0 分間反応後、被験細胞を洗浄して、結合した 9 F 1 1 を蛍光標識した抗ヒト I g M 抗体で染色し、これをフローサイトメトリーにかけて解析した。その結果、ヒト T 細胞株である M O L T - 4 細胞は染色されないが、H I V - 1 / I I I B 等を感染させると強く染色され、9 F 1 1 抗原が発現することがわかった。しかし、H I V - 1 が感染していなくても、前赤芽球 (M e g a k a r y o c y t e s) 系細胞株である U 9 3 7 は染色された。そこで、9 F 1 1 抗原は分化抗原である可能性があると考え、末梢血液細胞、末梢血リンパ球、末梢血リンパ球にフィトヘモアグルチニン (P H A) を添加して 3 日間培養した活性化リンパ球などについても検討を行った。末梢血液細胞と未刺激の末梢血リンパ球では染色性は認められなかったが、P H A で刺激した活性化 T リンパ球では強い染色性が認められ、9 F 1 1 抗原は活性化 T リンパ球に発現してくる分化抗原であることが明らかとなった。

【0015】

【実施例 2】 9 F 1 1 抗体による補体介在性細胞障害反応

被検細胞を予め放射性同位元素の ^{51}Cr で標識しておき、この標識被験細胞 ($5 \times 10^5 / \text{ml}$ の濃度に培養液中に浮遊) $40 \mu\text{l}$ に、 $40 \mu\text{l}$ の 9 F 1 1 抗体 (種々の濃度に振った) と $20 \mu\text{l}$ のヒト新鮮血清 (補体血清) を加えてマイクロタイタープレート上にて 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心して細胞を沈下させ、細胞溶解によって上清中に放出された ^{51}Cr の放射能活性を、細胞溶解反応の指標として測定した。U 9 3 7 細胞、M O L T - 4 / I I I B (H I V - 1 を感染した M O L T - 4 細胞) 及び、P H A で活性化した末梢血由来リンパ芽球など、9 F 1 1 抗原を発現している細胞は $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ の 9 F 1 1 が存在すると補体を介した細胞溶解を起こした。これに対し、ヒト血清を 56 度 C で加熱しておいた非働化血清を用いたときには細胞溶解は起こらず、9 F 1 1 による細胞溶解反応にはヒト補体反応が不可欠であった。

【発明の効果】

【0016】 活性化リンパ球に発現する分化抗原に対する本発明のヒト I g M モノクローナル抗体は、活性化リンパ球を補体反応を介して溶解する機能を発揮するので、体内で異常に活性化したリンパ球を制御する治療剤として活用すること

が出来る。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 活性化リンパ球を補体を介して制御するヒト I g M抗体および該ヒト I g M抗体を有効成分とする免疫反応制御剤等を提供すること。

【課題の解決手段】 免疫グロブリンの遺伝子に関わるヒト染色体を導入したマウスにH I V感染培養細胞を免疫した動物の脾細胞をマウス骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマを作成し、クローニングしたハイブリドーマで、活性化リンパ球の分化抗原に反応して補体存在下で細胞溶解を起こすヒト I g Mモノクローナル抗体を産生する細胞株を得た。

【選択図】 「なし」

特願 2002-227952

出願人履歴情報

識別番号

[593186459]

1. 変更年月日

1993年10月 7日

[変更理由]

新規登録

住 所

福岡県福岡市城南区干隈1丁目5番1号

氏 名

岡田 秀親

2. 変更年月日

1996年 3月29日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番1号 エクレール桜

山206号

氏 名

岡田 秀親

特願 2002-227952

出願人履歴情報

識別番号

[502282571]

1. 変更年月日

2002年 7月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10番地1号 エクレール

桜山206

氏 名

岡田 則子